

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN (PAG) SECRETADAS POR EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES DE RUMIANTES DOMÉSTICOS

Serrano, B.¹, Yániz, J.², Sanz, A.¹, López-Gatius, F.³, Garbayo, J.M.¹

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Ctra. de Montañana, 930; 50059. Zaragoza. bserranop@aragon.es

² Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza, Huesca.

³ Departamento de Producción Animal. Universidad de Lleida, Lleida.

INTRODUCCIÓN

La complejidad de los mecanismos que intervienen en la implantación y el desarrollo placentario hacen que todavía se desconozca el papel de muchas de las moléculas presentes en el proceso de la gestación. Las proteínas asociadas a la gestación (PAG) son, junto con moléculas como el lactógeno placentario y el IFN- τ , producto de las células trofoblásticas del embrión y tejido placentario de mamíferos ungulados. La conservación y homología de las PAG presentes en animales de los órdenes *Artiodactyla*, *Perisodactyla*, *Carnivora* y *Rodentia* proporcionan una idea de su importancia en la fisiología de la reproducción (Hughes *et al.*, 2003).

En rumiantes, las PAGs se expresan en las células mononucleadas ó binucleadas del trofotodermo, desde donde son secretadas al torrente sanguíneo materno (Wooding *et al.*, 2005). El estudio de la expresión de ARNm en la placenta de rumiantes ha revelado la existencia de multitud de genes de PAG pero, pese a los esfuerzos realizados, el número de proteínas purificadas es muy inferior al número de ADNc detectados (Xie *et al.*, 1997b). La elevada homología que caracteriza estas moléculas dificulta la purificación y aislamiento de formas simples, por lo que sólo se ha conseguido analizar la secuencia de un número muy reducido de PAGs.

La purificación de PAGs nativas o recombinantes ha permitido la puesta a punto de técnicas de diagnóstico de la gestación mediante RIA o ELISA, así como su empleo como marcadores de desordenes metabólicos asociados a la gestación, tanto en especies de rumiantes domésticas como en salvajes (Sousa *et al.*, 2006). Algunas características de las PAGs, como la expresión temporal de la mayoría de sus miembros o la variabilidad en el patrón de glicosilación que determina la vida media de la molécula en el medio materno, afectan la optimización de dichas técnicas.

En la actualidad, el empleo de lectinas específicas de las cadenas de carbohidratos presentes en las PAGs ha permitido una mejora de los protocolos de purificación (Klisch *et al.*, 2005), así como un mayor conocimiento del mecanismo de glicosilación post-traduccional producido en la placenta (Klisch *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo fue la detección y el estudio de las PAG secretadas al seno uterino por embriones preimplantacionales de rumiantes domésticos mediante el empleo de anticuerpos específicos y la lectina *Vicia Villosa*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El aislamiento de las PAGs se realizó a partir de los fluidos uterinos obtenidos en la recuperación de embriones ovinos de raza Rasa Aragonesa (día 15 y 17), caprinos de raza Blanca Celtibérica (día 16 y 18) y bovinos de raza Pirenaica (día 16), según el protocolo descrito por Garbayo *et al.*, (2007). Los fluidos recolectados se procesaron según el día y la especie, se dializaron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 a 4º C y se concentraron en tubos Amicon Ultra de 15 ml (Millipore). La concentración total de proteína se midió por el método Bradford (Coomassie Protein Assay Kit, Pierce 23200), usando Albúmina sérica bovina como estándar. Los extractos proteicos obtenidos se redujeron con tampón SDS-sample (50

mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glicerol y 0.5% (w/v) Bromofenol blue) y se separaron aproximadamente 50 µg de cada muestra mediante electroforesis SDS-PAGE en geles del 4-12%. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas Immobilon P (Millipore) y se incubaron separadamente con la lectina *Vicia Villosa* (Vector Laboratories) y el suero anti-caPAG 706+707 (cortesía del Dr. J. F. Beckers), siguiendo el protocolo descrito por Klisch *et al.* (2005).

El tratamiento con la enzima PNGasa F (New England Biolabs) para la digestión de las N-glicosilaciones presentes en las PAGs se realizó según las instrucciones del fabricante. Las muestras digeridas se separaron en electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron mediante Western blot con el suero anti-caPAG 706+707.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de inmunodetección con la lectina *Vicia villosa* y el anticuerpo anti-caPAG 706+707 confirmaron la presencia de moléculas relacionadas con las PAGs bovinas, caprinas y ovinas secretadas en el seno uterino en el momento de la implantación. Se detectó, tanto con el anticuerpo como con la lectina, una molécula de un peso molecular aparentemente de 66 kDa en todos los fluidos uterinos (Fig. 1), que además coincidió con el tamaño de la primera proteína bovina purificada (boPAG1) por Zoli *et al.* (1991). También se detectaron, por el anticuerpo y muy levemente por la lectina, varias bandas de 82 kDa y 53 kDa tanto en los fluidos uterinos ovinos como los caprinos. Previamente, otros autores también han descrito moléculas de PAG de tamaño similar en ovino (Xie *et al.*, 1997a), caprino (Garbayo *et al.*, 1998) y bovino (Klisch *et al.*, 2005).

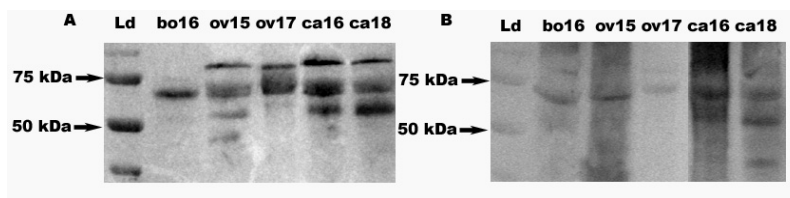


Figura 1. Western blot con suero anti-caPAG 706+707 (A) y lectina *Vicia Villosa* (B) en fluidos uterinos obtenidos en la recuperación de embriones bovinos (16 días), ovinos (15 y 17 días) y caprinos (16 y 18 días).

Como ocurre en otros miembros de la familia de las proteasas aspárticas, las PAGs poseen una estructura de 380 aminoácidos que correspondería con un peso molecular teórico de 42 kDa. Sin embargo, el peso inferido a partir de su ADNc no se corresponde con el tamaño detectado en SDS-PAGE, que puede variar entre 47 y 90 kDa (Xie *et al.*, 1996). Esta variación en el tamaño puede ser debida al proceso de glicosilación post-traducciona producido en la placenta.

Para estudiar este fenómeno se realizó un tratamiento con PNGasa F que redujo el peso molecular de las bandas detectadas en los fluidos uterinos ovinos y caprinos de 82 kDa y 53 kDa, a 77 kDa y 47 kDa, respectivamente (Fig. 2). En los fluidos uterinos bovinos, el patrón de glicosilación de la proteína detectada anteriormente por el anticuerpo apenas se pudo observar, posiblemente debido a la baja concentración de la proteína. La reducción mostrada por las moléculas era semejante a la descrita por Xie *et al.* (1996) en la ovPAG1, purificada en placenta ovina de entre 15 y 25 días. El número de N-glicosilaciones presentes en las PAG en el contexto N-x-T/S pueden variar entre 1 y 7 (Xie *et al.*, 1997b). La variabilidad existente en el grado de glicosilación parece ser un factor fundamental que regula la vida media de la proteína en el plasma, de ahí su importancia para optimizar el diagnóstico de gestación basado en la PAG (Klisch *et al.*, 2005).

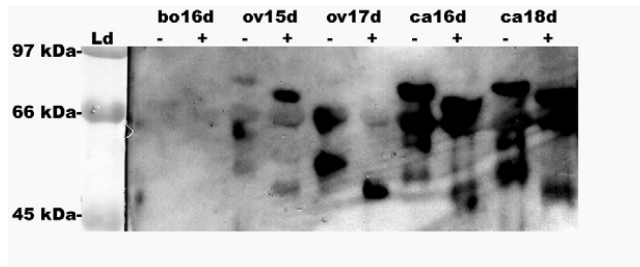


Figura 2. Western blot con anti-caPAG 706+707 de la digestión con PNGasa F realizada a los fluidos uterinos obtenidos en la recuperación de embriones bovinos (16 días), ovinos (15 y 17 días) y caprinos (16 y 18 días).

La inmunoreactividad mostrada por el anticuerpo de origen caprino frente a las proteínas ovinas y bovinas se debe a que las PAG de las tres especies se encuentran filogenéticamente muy cercanas e incluso entremezcladas, como es el caso del subgrupo formado por la *ovPAG10*, *ovPAG11*, *caPAG12* y *boPAG15*, expresadas en las células binucleadas del trofotodermo al comienzo de la gestación y con una similitud en torno al 94% a nivel de nucleótidos (Garbayo *et al.*, 2007). Pese a la baja intensidad de las bandas detectadas por la lectina *Vicia Villosa*, la similitud mostrada con las bandas detectadas por el anticuerpo confirma su utilidad para la purificación de las PAGs secretadas al comienzo de la gestación.

De estos resultados se desprende que las primeras glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) producidas en el momento de la implantación son detectadas tanto por la mezcla de anticuerpos 706+707 como por la lectina *Vicia Villosa*, por lo que pueden ser herramientas clave para el estudio del papel que desempeñan las PAG expresadas en rumiantes domésticos durante el periodo implantacional.

La posible detección de las PAGs en plasma o leche tendrá que ser objeto de futuros trabajos, puesto que, de confirmarse este hecho, podría servir para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico de gestación temprana en rumiantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Garbayo, J.M., Remy, B., Alabart, J.L., Folch, J., Wattiez, R., Falmagne, P., Beckers, J.F., 1998. Biol. Reprod. 58, 109-115.
- Garbayo, J.M., Serrano, B., Lopez-Gatius, F. 2007. Anim. Reprod. Sci. (in press).
- Hughes, A.L., Green, J.A., Piontkivska, H., Roberts, R.M. 2003. Mol. Biol. Evol., 20, 1940-1945.
- Klisch, K., Sousa, N., Beckers, J., Leiser, R., Pich, A. 2005. Mol. Reprod. Dev., 71, 453-460.
- Klisch, K., Boos, A., Friedrich, M., Herzog, K., Feldmann, M., Sousa, N., Beckers, J. F., Leiser, R., Schuler, G. 2006. Reproduction, 132, 791-798.
- Sousa N. M., Ayad, A., Beckers, J.F., Gajewsky, Z. 2006. J. Physiol. Pharmacol., 57, suppl 8, 153-171.
- Wooding, F.B.P., Roberts, R.M., Green, J.A. 2005. Placenta, 26, 807-827.
- Xie, S., Nagel, R.J., Green, J.A., Beckers, J.F., Roberts, R.M. 1996. Biol. Reprod., 54, 122-129.
- Xie, S., Green, J.A., Bao, B., Beckers, J.F., Valdez, K.E., Hakami, L., Roberts, R.M. 1997a. Biol. Reprod., 57, 1384-1393.
- Xie, S., Green, J.A., Bixby, J.B., Szafranska, B., DeMartini, J.C., Hecht, S., Roberts, R.M. 1997b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12809-12816.
- Zoli AP, Beckers J.F., Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F. 1991. Biol. Reprod., 45, 1-10.